

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461215

研究課題名(和文)慢性腎臓病における低酸素転写調節因子の病態制御機構

研究課題名(英文)Regulation of hypoxia inducible genes in chronic kidney disease

研究代表者

田中 哲洋(TANAKA, Tetsuhiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90508079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：尿細管間質の低酸素状態は、慢性腎臓病の病態増悪因子である。本研究では、低酸素誘導因子HIFに対する調節因子であるHIF3の機能解析を行った。HIF3は100-200程度存在するHIF標的遺伝子群のうち、lysyl oxidase(LOX)の低酸素発現誘導を選択的に抑制した。また、複数のラットCKDモデル(尿管結紮モデル、1型糖尿病モデル)において、LOXの薬理的阻害は細胞外基質の蓄積を抑制し、抗線維化作用を発揮した。HIF3によるLOXの選択的発現抑制は、低酸素腎における抗線維化機構として重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Tubulointerstitial hypoxia is a final common pathway in progressive kidney disease. Hypoxia inducible factors (HIF1 and HIF2) play important roles for the adaptation of intrinsic cells of the kidney. This study aimed to characterize the functional roles of HIF3, a putative suppressor against other HIFs. Among 100-200 HIF target genes, HIF3 selectively suppressed the hypoxic induction of lysyl oxidase(LOX). In vivo, pharmacological inhibition of LOX led to amelioration of interstitial fibrosis in multiple models of CKD, such as unilateral ureteral obstruction and diabetic kidney disease. Results of these studies highlight a novel antifibrotic mechanisms of HIF3, which was mechanistically achieved by the selective inhibition of LOX expression.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 低酸素

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)において、残腎機能は尿細管間質障害の程度と相関する。尿細管における慢性低酸素状態はCKDの病態を進行させる増悪因子である。低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor: HIF)は尿細管上皮細胞の低酸素環境応答を司る主要な転写因子であり、虚血性障害に対して保護的に作用する。一方で、遺伝子改変や薬理学的操作を施してHIFを過度に機能亢進させると、線維化が惹起され、尿細管間質障害が増悪する。このため、HIFの活性を適切なレベルに調節する内在性機構が腎疾患の進行抑制に重要であると考えられる。しかしながら、HIFの調節因子が腎疾患の進行に与える影響を調べた研究は皆無である。

### 2. 研究の目的

本研究ではそのような背景から、HIFに対する負の制御因子として提唱されているHIF3に注目し、CKDの病態制御における機能的役割の解明を試みた。

これまでの研究歴において、HIF3は数多くのHIF標的遺伝子のうち、lysyl oxidase (LOX)の発現を選択的に抑制することが判明している。LOXは腎臓、膵臓、心臓、骨格筋、胎盤などに発現して、コラーゲンの架橋を介して細胞外基質の蓄積を媒介する因子であることから、CKDにおいて、HIF3によるLOXの抑制は腎線維化に拮抗する可能性が考えられた。本研究では、同仮説の検証を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) LOX 遺伝子のプロモーター解析

ヒトLOX遺伝子のプロモーターを核酸増幅反応(PCR)法によってクローニングし、ルシフェラーゼ発現ベクターの上流に組み込んだ。次に本ベクターを培養近位尿細管細胞(HK-2細胞)に一過性発現させ、レポーター活性を測定した。また、HIF3が本プロモーターの活性に与える影響を、HIF3発現ベクターとの共発現によって検討した。

次にLOXプロモーターのモチーフ検索を行い、HIF結合部位およびHIF3による抑制部位の候補を同定した。その後、それらの部位に対して遺伝子変異導入を行い、機能性の検証を行った。

#### (2) LOX の阻害が腎線維化に及ぼす影響

HIF3の主要な標的因子であるLOXがCKDの尿細管間質線維化に及ぼす影響を、特異的阻害剤である  $\alpha$ -aminopropionitrile (APN)を用い、下記の2つの動物モデルにおいて検討した。

#### (3) CKD モデルの解析

CKDモデルとして、腎線維化モデルとして汎用される尿管結紮モデル(UUO)と、1型糖尿病モデルである streptozotocin(STZ)モデルを解析対象とした。

UUOは、ラットにペントバルビタール麻酔下で腹部正中切開を行い、左尿管を結紮して作製した。尿管結紮後第7、第14病日に採材し、尿細管間質病変の組織学的評価を行った。1型糖尿病モデルはSTZ(65mg/kg)を腹腔内注射して疾患を惹起した。疾患惹起後3週間にて採材し、UUOと同様の病理組織評価を行った。

上記の動物実験は、学内動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) HIF3がLOX 遺伝子の発現を選択的に抑制する機序

「LOX 遺伝子のプロモーター上には複数のHIF1 結合エンハンサーが存在し、HIF3 がそれらの各々に多段階で介入することにより、選択的な抑制がもたらされている」との仮説に対して、プロモーターアッセイや遺伝子変異導入法を用いて *in silico* ならびに *in vitro* にて検討した。

ヒトLOXプロモーターに対してコンピュータープログラムによるモチーフ検索を行ったところ、そのプロモーターには転写開始点より500塩基上流以内にHIF結合エンハンサー(hypoxia-responsive element: HRE)が合計6個確認された。次にLOXプロモーターのレポータープラスミドを作製し、培養近位尿細管細胞(HK-2)に一過性トランスフェクションし、同プロモーターの低酸素誘導およびHIF3による抑制を確認した。さらにモチーフ検索によって同定されたHREの候補6個に対して遺伝子変異導入を行い、同様のアッセイを繰り返したところ、複数の機能的HREが同定された。HIF3の過剰発現実験を行ったところ、HIF3がそれら複数のエンハンサーに対して独立して多段階で抑制的に介入することが明らかになった。よって本機構は、HIF3によるLOX発現の強力かつ選択的な抑制機序を説明し得るものと考えられた。

一方、LOXプロモーターへのHIF結合はNOTCH1に依存することが報告されている。よって本研究において、HIF3によるNOTCH活性への影響を調べた。低酸素刺激によりNOTCH1およびその標的遺伝子であるHes1の有意な発現上昇が認められたが、これらの変化はHIF3の過剰発現によって打ち消された。さらにNOTCH阻害剤を用いて、LOX遺伝子プロモーターの低酸素誘導に与える影響を検討したところ、LOXの低酸素誘導が有意に抑制された。

以上により、HIF3が低酸素下でLOXを選択的に抑制するメカニズムとして、複数のHREに対する協調的な抑制機構、およびNOTCH活性の抑制を介するHIF結合の減弱化、の少なくとも2つが存在することが明らかとなった。

#### (2) CKD モデルにおいて、HIF3 が腎線維化に及ぼす影響の検討

HIF3がLOXの発現抑制を介してCKDの尿細管

間質線維化を抑制する、という仮説を、HIF3 に対する in vivo siRNA 法および LOX 特異的阻害剤を用いて検討した。

既報に倣い、in vivo siRNA 法を用いて実験動物個体レベルでの HIF3 ノックダウンを試みた。予備実験として、健常マウスに対して siRNA を導入し、腎臓、肝臓、肺をはじめ多臓器において標的遺伝子のノックダウン効率を検討したところ、肝臓において高効率に標的遺伝子のノックダウンが達成された一方、腎臓においては複数の siRNA 配列に対して有効な標的遺伝子ノックダウンが達成できなかった。よって、腎臓を標的とする in vivo siRNA 法による HIF3 ノックダウンは、本研究目的に適していないと判断した。

(3) CKD モデルにおいて、LOX の阻害が腎線維化に及ぼす影響

上記の結果に基づいて、次に、HIF3 の標的遺伝子である LOX を特異的阻害薬によって阻害する方針とした。LOX の機能阻害実験は、特異的阻害剤である  $\alpha$ -aminopropionitrile (APN) を用い、既報に倣って遂行した (Higgins DF. J Clin Invest. 2007)。

(4)尿管結紮モデルにおける LOX 阻害の影響  
LOX 阻害群および対照群のラットに対して尿管結紮モデル(UUO)を作製し、第 7、第 14 病日に尿細管間質病変の組織学的評価を行った。免疫組織化学法によって I 型コラーゲン、III 型コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外基質タンパクに対する免疫染色を行ったところ、LOX 阻害によってこれらの陽性領域が小さくなり、腎線維化が軽減することが明らかになった。また、同様の傾向は collagen I, III, fibronectin の mRNA 定量によっても確認された。さらに、同阻害による影響は活性化線維芽細胞 (SMA 免疫染色) の減少および尿細管脱分化(vimentin 免疫染色)の軽減を伴っており、総合的に尿細管間質病変の軽減が確認された。

(5) I 型糖尿病モデルにおける LOX 阻害の影響  
前項(4)の研究成果により、LOX の特異的阻害は UUO ラットにおいて抗線維化作用を有することが明らかになった。よって本項では、同知見の外挿性を STZ 誘発 I 型糖尿病モデルにおいて検討した。

ラットに STZ を投与し、3 週間後に採材して病理組織評価を行った。免疫染色によって尿細管間質領域の細胞外基質の発現を評価したところ、LOX 阻害群において I 型、III 型コラーゲンやフィブロネクチンの発現が有意に抑制されていた。さらに、尿細管細胞の肥大・線維化シグナルに対する影響の検討として、リン酸化(p)ERK、pAkt、pP70S6K の発現比較を行った。ウエスタンブロット法によってこれらのタンパクの定量評価を行ったところ、LOX 阻害群においてこれらのタンパクがいずれも有意に低下していたことから、

これらは LOX 阻害による抗線維化作用を説明する分子機構であると考えられた。腎臓における transforming growth factor (TGF)- $\alpha$  発現量も LOX の阻害により有意に抑制されていた。

以上により、LOX の機能阻害は様々な CKD モデルにおいて抗線維化作用をもたらすことが判明し、HIF-3 による抗線維化作用を担う分子機序の一つであると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

Tanaka S, Tanaka T, Kawakami T, Takano H, Sugahara M, Saito H, Higashijima Y, Yamaguchi J, Inagi R, Nangaku M. Vascular adhesion protein-1 enhances neutrophil infiltration by generation of hydrogen peroxide in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 査読有. 2017 Mar 16. pii: S0085-2538(17)30041-8. doi:10.1016/j.kint.2017.01.014. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28318627.

Tanaka T. A mechanistic link between renal ischemia and fibrosis. *Med Mol Morphol.* 査読有. 2017 Mar;50(1):1-8. doi: 10.1007/s00795-016-0146-3. Review. PubMed PMID: 27438710.

Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M. Renal Hypoxia in CKD; Pathophysiology and Detecting Methods. *Front Physiol.* 査読有. 2017 Feb 21;8:99. doi:10.3389/fphys.2017.00099. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 28270773; PubMed Central PMCID: PMC5318422.

Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M. Mechanisms of metabolic memory and renal hypoxia as a therapeutic target in diabetic kidney disease. *J Diabetes Investig.* 査読有. 2017 Jan 17. doi: 10.1111/jdi.12624. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID:28097824.

Yamaguchi J, Tanaka T, Inagi R. Effect of AST-120 in Chronic Kidney Disease Treatment: Still a Controversy? *Nephron.* 査読有. 2017;135(3):201-206. doi:10.1159/000453673. Epub 2016 Dec 14. Review. PubMed PMID: 27960172.

Tanaka T. Expanding roles of the hypoxia-response network in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 査読有. 2016 Dec;20(6):835-844. PubMed

PMID: 26857707.

Mimura I, Tanaka T, Nangaku M. New insights into molecular mechanisms of epigenetic regulation in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 査読有. 2016 Aug 25. doi: 10.1111/1440-1681.12663. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27560313.

Tanaka T, Nangaku M. [Therapeutic approaches targeting fibrosis and hypoxia in the kidney]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 査読有. 2015;57(7):1215-24. Japanese. PubMed PMID: 26665613.

Mimura I, Tanaka T, Nangaku M. How the Target Hemoglobin of Renal Anemia Should Be? *Nephron*. 査読有. 2015;131(3):202-9. doi: 10.1159/000440849. Epub 2015 Sep 19. Review. PubMed PMID: 26381503.

Tanaka S, Tanaka T. How to Supplement Iron in Patients with Renal Anemia. *Nephron*. 査読有. 2015;131(2):138-44. doi: 10.1159/000440773. Epub 2015 Sep 19. PubMed PMID: 26381391.

Yamaguchi J, Tanaka T, Eto N, Nangaku M. Inflammation and hypoxia linked to renal injury by CCAAT/enhancer-binding protein. *Kidney Int*. 査読有. 2015 Aug;88(2):262-75. doi: 10.1038/ki.2015.21. Epub 2015 Feb 18. PubMed PMID: 25692954.

Nangaku M, Inagi R, Mimura I, Tanaka T. Epigenetic Changes Induced by Hypoxia-Inducible Factor: a Long Way Still To Go as a Target for Therapy? *J Am Soc Nephrol*. 査読有. 2015 Jul;26(7):1478-80. doi: 10.1681/ASN.2014121161. Epub 2015 Jan 13. PubMed PMID: 25587069.

Higashijima Y, Tanaka T, Yamaguchi J, Tanaka S, Nangaku M. Anti-inflammatory role of DPP-4 inhibitors in a non-diabetic model of glomerular injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有. 2015 Apr 15;308(8):F878-87. doi: 10.1152/ajprenal.00590.2014. Epub 2015 Feb 4. PubMed PMID: 25656369.

Nangaku M, Mimura I, Yamaguchi J, Higashijima Y, Wada T, Tanaka T. Role of Uremic Toxins in

Erythropoiesis-Stimulating Agent Resistance in Chronic Kidney Disease and Dialysis Patients. *J Ren Nutr*. 査読有. 2015 Mar;25(2):160-163. doi: 10.1053/j.jrn.2014.10.011. Epub 2014 Dec 30. Review. PubMed PMID: 25556149.

Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有. 2014 Dec 1;307(11):F1187-95. doi: 10.1152/ajprenal.00425.2014. Epub 2014 Oct 1. PubMed PMID: 25350978.

Kawakami T, Mimura I, Shoji K, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia and fibrosis in chronic kidney disease: crossing at pericytes. *Kidney Int Suppl* (2011). 査読有. 2014 Nov;4(1):107-112. Review. PubMed PMID: 25401039; PubMed Central PMCID: PMC4220514.

Tanaka T, Higashijima Y, Wada T, Nangaku M. The potential for renoprotection with incretin-based drugs. *Kidney Int*. 査読有. 2014 Oct;86(4):701-11. doi: 10.1038/ki.2014.236. Epub 2014 Jul 9. PubMed PMID: 25007170.

Tanaka T, Nangaku M. ANO1: an additional key player in cyst growth. *Kidney Int*. 査読有. 2014 May;85(5):1007-9. doi: 10.1038/ki.2013.436. PubMed PMID: 24786872.

[学会発表](計 12件)

Tetsuhiro Tanaka. Novel Therapeutic Modality of Kidney Diseases and Its Complication by PHD Inhibition. *Kidney Week 2016*, the annual meeting of the American society of nephrology, Nov 15-20, Chicago (USA).

田中哲洋. 原発性糸球体疾患・尿細管間質性疾患. 腎臓専門医受験のための教育セミナー. 第59回日本腎臓学会学術集会. 2016年6月17日~19日. パシフィコ横浜(横浜).

Tetsuhiro Tanaka. Emerging, potential therapeutic strategies in diabetic kidney disease. 11th Annual convention and Scientific seminar 2015, Dec 21-22, Dhaka (Bangladesh).

Tetsuhiro Tanaka. A search for circulating permeability factors in focal segmental glomerulosclerosis.

11th Annual convention and Scientific seminar 2015, Dec 21-22, Dhaka (Bangladesh).

Tetsuhiro Tanaka. GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors and amelioration of kidney injury. Kidney Week 2015, the annual meeting of the American society of nephrology, Nov 3-8, San Diego (USA).

Tetsuhiro Tanaka. Expanding roles of tubulointerstitial hypoxia and its regulation in kidney. the 1 st international seminar on the construction and management of renal diseases 2015, 11Sep - 13Sep, Zhejiang Province (China).

田中哲洋 HIFと貧血と鉄代謝(hepcidin). 第 60 回日本透析医学会学術集会・総会. 2015 年 6 月 26 日~28 日 .パシフィコ横浜 (横浜).

Tetsuhiro Tanaka, Shinji Tanaka, Hisako Saito, Junna Yamaguchi, Yoshiki Higashijima, Masaomi Nangaku. Inhibition of collagen cross-linking by lysyl oxidase prevents hypertrophy and protects from diabetic nephropathy. ERA-EDTA 52nd meeting 2015. May28-31. London (the United Kingdom).

田中哲洋、田中真司、山口純奈、東島佳毅、南学正臣. 慢性腎臓病において低酸素が酸化ストレス障害に拮抗する新規分子機構. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日~27 日 .パシフィコ横浜(横浜).

田中哲洋. 慢性腎臓病における低酸素応答ネットワークの解明. 第 57 回日本腎臓学会学術集会. 2014 年 7 月 4 日~6 日 .パシフィコ横浜(横浜).

田中哲洋. 新規腎性貧血治療薬としての PHD 阻害薬. 第 57 回日本腎臓学会学術集会. 2014 年 7 月 4 日~6 日 .パシフィコ横浜(横浜).

Tetsuhiro Tanaka, Yoshiki Higashijima, Shinji Tanaka, Junna Yamaguchi, Masaomi Nangaku. A non-transcriptional role of hypoxia-inducible factor (hif)-1 in defense against dna double strand injury. ERA-EDTA 51st meeting 2014. May31-June3. Amsterdam (the

Netherlands).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 哲洋 (TANAKA Tetsuhiro)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 9 0 5 0 8 0 7 9

##### (2) 研究分担者

稲城 玲子 (INAGI Reiko)  
東京大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号: 5 0 2 3 2 5 0 9

南学 正臣 (NANGAKU Masaomi)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 9 0 3 1 1 6 2 0

和田 健彦 (WADA Takehiko)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号: 9 0 4 4 7 4 0 9

##### (3) 連携研究者

該当なし  
( )  
研究者番号:

##### (4) 研究協力者

該当なし  
( )